

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

**Elektrophoretische
und immunoelektrophoretische
Untersuchungen über den Effekt von
Diphthin auf die γ -Globuline
von normalen und pathologischen
Menschen- und Tierseren**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Karl Fritz Stockamp
aus Gießen/Lahn

Marburg 1966

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

**Elektrophoretische
und immunoelektrophoretische
Untersuchungen über den Effekt von
Diphthin auf die γ -Globuline
von normalen und pathologischen
Menschen- und Tierseren**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Karl Fritz Stockamp

aus Gießen/Lahn

Marburg 1966

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg an der Lahn
am 21.6.1966

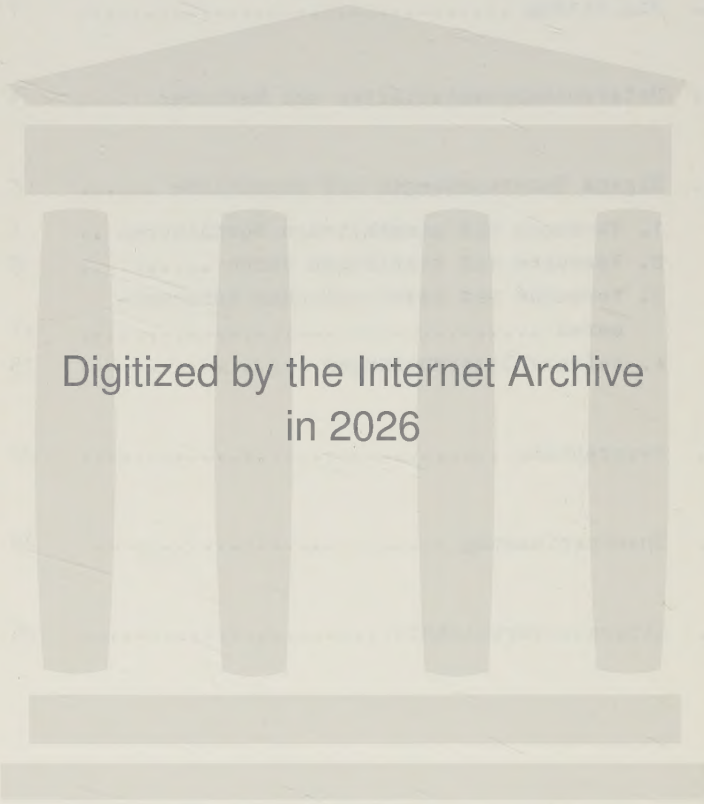
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. O. Braun-Falco
Referent: Dozent Dr. W. Schiff
Correferent: Prof. Dr. R. Siegert

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsübersicht

	Seite
A. Einleitung	1
B. Untersuchungsmaterialien und Methoden	3
C. Eigene Untersuchungen und Ergebnisse	5
1. Versuche mit menschlichen Normalseren ..	5
2. Versuche mit tierischen Seren	9
3. Versuche mit pathologischen Menschen- seren	11
4. Weitere Untersuchungen	15
D. Besprechung	22
E. Zusammenfassung	25
F. Literaturverzeichnis	26



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A. E i n l e i t u n g

Aus Kulturfiltraten von toxischen und atoxigenen Diphtheriebakterien und von Pseudodiphtheriebakterien ist von SCHIFF (1961) eine als "Diphthin" bezeichnete Substanz isoliert worden, die bemerkenswerte Eigenschaften besitzt: In vitro geht diese Substanz eine serologisch nicht erfaßbare Bindung mit Hämagglutinin (Hämolysinen) ein, die sich erst im tierischen Organismus als Antikörperhemmung äußert. (Wird bei entsprechenden Tierexperimenten, z.B. an der Maus, ein artspezifisches Immunhämagglutinin injiziert, so tritt bei vorausgegangener Inkubierung mit Diphthin ein Hämolyseschutz gegenüber 6 - 8 Letaldosen dieses Serums ein. Bei Verwendung eines heterospezifischen und daher verträglichen Hämagglutinins, z.B. Anti-Schaf-Hämagglutinin, ist diese diphthinbedingte intravitale Antikörperhemmung titrimetrisch im Serum der Versuchstiere erfaßbar.) Dieser Hemmeffekt ist jedoch kein absoluter, da er je nach Art des verwendeten Hämagglutinins (Hämolysins) nicht über 4 - 7 Verdünnungsstufen hinausgeht, d.h. eine geringe Antikörperquote bleibt unbeeinflusst. Die zur Erzielung einer maximalen Hemmwirkung erforderliche Diphthin-mindestmenge hängt von der vorausgegangenen Inkubationsdauer ab. Während die Spezifität des Antikörpers für die Diphthinbindung nach bisherigen Erfahrungen bedeutungslos zu sein scheint, spielt seine tierische Herkunft offenbar eine entscheidende Rolle. So reagiert das Diphthin gut mit Seren von Mensch und Kaninchen, läßt aber Hämagglutinin von Pferd, Rind und Schaf unbeeinflusst. Ferner ergaben Inkubationsversuche mit Hämagglutinin/Diphthin-Gemischen, daß der Hemmeffekt bei Temperaturen zwischen 5° und 37° C etwa gleich groß war, während er bei 56° C fast völlig fehlte und auch bei Nachinkubation in niederen Temperaturbereichen

ausblieb (SCHIFF 1964a, 1964b). Außer dieser unspezifischen Hämagglutininhemmung ist das Diphthin imstande, einen in Diphtherieseren enthaltenen, diphthinspezifischen Antikörper zu binden. Diese Diphthin/"Antidiphthin"-Reaktion läuft ohne Präzipitatbildung und Komplementverbrauch ab. Demnach dürfte dem Diphthin eine zweifache Bindungsfähigkeit zuzusprechen sein, die durch Hämagglutinin bzw. durch Antidiphthin wechselseitig blockierbar ist. Weiterhin wird durch hohe Konzentrationen von Diphthin die Präzipitationsreaktion zwischen gereinigtem Diphtherietoxin und Diphtherie-Antitoxin stark gehemmt (SCHIFF 1964c). Nach vorläufigen physikalisch-chemischen Untersuchungen ist das Diphthin ein atoxisches Polypeptid mit einem Mol.-Gew. von etwa 15.000. In Lösung ist es weitgehend hitzestabil. Mit den üblichen Eiweißfärbemethoden läßt es sich nur schwer anfärben (SCHIFF 1964c).

Was das auffallende Antikörperhemmungs-Phänomen betrifft, so war SCHIFF (1961, 1964a, 1964b) der Ansicht, daß es auf eine unspezifische adsorptive Bindung zwischen Hämagglutinin und Diphthin zurückzuführen ist, wobei der so entstandene Komplex im tierischen Organismus kurzfristig eliminiert wird. Diese Schlußfolgerung stützte sich auf den von SCHIFF aufgefundenen und vielfältig abgewandelten serologischen Tierversuch. Da die Untersuchungen sich nur auf Hämagglutinine bzw. Hämolysine erstreckten, stellten sich die Fragen, ob die Aktivität auch auf anderem Weg zu erfassen sei und wieweit sie sich auf weitere γ - bzw. Immunglobuline auswirkt.

Aufgabe vorliegender Arbeit war daher, durch agar- und immunoелеktrophoretische Untersuchungen den Effekt des Diphthins auf die γ -Globuline von normalen und pathologischen Menschen- und Tierseren zu studieren. Gleichzeitig sollte damit eine weitere Klärung des Wirkungsmechanismus von Diphthin versucht werden.

B. . U n t e r s u c h u n g s m a t e r i a l i e n u n d M e t h o d e n

Falls bei den Versuchen nicht anders vermerkt ist, erfolgten sie unter nachstehenden Bedingungen:

Es wurden verschiedene Chargen Diphthin verwendet, die nach dem Verfahren von SCHIFF (1964c) aus Kulturfiltraten des atoxischen Diphtheriebakterienstammes 29 619 in Pope-Bouillon gewonnen wurden. Die Diphthin-Reinsubstanz wurde 0,1%ig in 1/15 M Phosphatpuffer (pH 7,0) gelöst und anschließend im Wasserbad bis zum Kochen erhitzt, um störende Fermentaktivitäten (s.S. 7) zu beseitigen. Die Bestimmung der Diphthinaktivität erfolgte im serologischen Maustest (SCHIFF 1961). Hierzu wurden pro Maus 6 Std. bei Zimmertemperatur inkubierte Mischungen von 0,5 ml Anti-Schaf-Hämagglutinin vom Kaninchen mit fallenden Mengen Diphthin intravenös injiziert. 18 Std. post inj. wurden die Tiere entblutet, die gewonnenen Serumproben 30 min bei 56° C inaktiviert und anschließend auf ihren Gehalt an Anti-Schaf-Hämagglutinin geprüft. Bei einer maximalen diphthinbedingten Titerreduktion von 3 - 4 Verdünnungsstufen betrug die d i m (dosis inhibitans minima) der einzelnen Diphthinchargen einheitlich 0,0005 ml.

Bei der Diphthinbehandlung wurden 0,5 ml Serum mit 0,1 ml der 0,1%igen Diphthinlösung 24 Std. bei + 5° C inkubiert.

Die elektrophoretischen Untersuchungen wurden auf Papier und Agargel durchgeführt. Für die Papierelektrophorese benutzten wir einen Hochauflösungspuffer (nach GRÖNWALL u. ARONSSON)¹⁾ von pH 8,9. Die Laufzeit betrug 16 Std. bei einer Spannung von 4 V/cm. Für die Agar- und Immunoelktrophorese wurde ein Gerät der Firma LKB Produkter (Stockholm) verwendet. Als Puffer diente eine

¹⁾ Bezugsquelle: Firma LKB Produkter, Stockholm.

Lösung von 0,05 M Natriumdiäthylbarbiturat, 0,01 M Diäthylbarbitursäure und 0,05 M Natriumazetat in aqua dest. (pH 8,6 bei einer Ionenstärke von 0,1). Zur Herstellung des Agargels ist Difco Special Agar-Noble¹⁾ 1,25%ig in der auf die Hälfte verdünnten Pufferlösung verwendet worden. Die Elektrophorese-dauer betrug 80 min bei einer Spannung von 10 - 12 V/cm. An präzipitierenden mono- und polyvalenten Antiseren gebrauchten wir ausschließlich Handelspräparate. Die Färbung erfolgte mit Amidoschwarz 10B.

Die untersuchten Seren sind größtenteils bis zur Verwendung eingefroren worden.

¹⁾ Firma Difco Lab., Detroit (USA).

C. Eigene Untersuchungen und Ergebnisse

1. Versuche mit menschlichen Normalseren

Wie eingangs erwähnt wurde, ist die intravitale Häm-agglutinin-(Hämolysin-)Hemmung mit einer vorausgehenden Bindung dieser Antikörper erklärt worden. Um nachzuprüfen, ob sich der Diphthineffekt über die Hämagglutinine hinaus auswirkt, führten wir zunächst Papierelektrophoreseversuche mit Menschenseren durch. Hierbei sind die gleichen Inkubationsbedingungen wie beim serologischen Maustest eingehalten worden (6 std. Inkubation von Menschenserum mit einem hochwirksamen Filtrat (d i m = 0,0025) im Verhältnis 4:1). Da wir auf diese Weise keinen Unterschied gegenüber unbehandeltem Serum feststellen konnten, setzten wir die Versuche bei verlängerter Inkubationsdauer und mit größeren Diphthinnmengen fort. Hierdurch erzielten wir eine Auftrennung der sonst optisch homogenen γ -Globulinzone in zwei Fraktionen. In der Abbildung 1 ist ein derartiges Versuchsbeispiel wiedergegeben, bei dem das Serum mit Diphtheriebakterienfiltrat im Verhältnis 2 : 1 bei Zimmertemperatur 12 Std. inkubiert worden war.

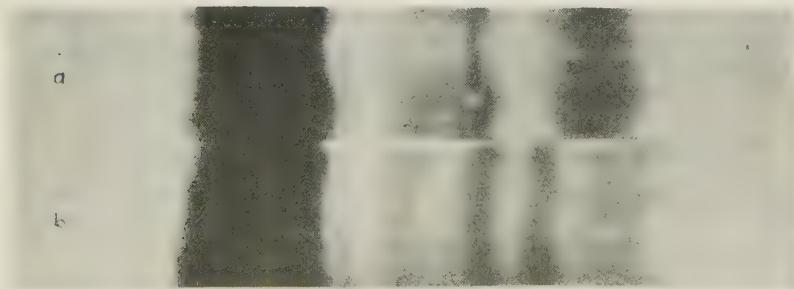


Abb. 1. Papierelektrophorese eines menschlichen Serums nach 12 std. Inkubierung mit
a) diphthinfreiem,
b) diphthinhaltigem Filtrat.

Entsprechende Resultate erhielten wir mit Lösungen von Diphthin-Reinsubstanz. Auch bei der Elektrophorese in Agargel ergaben sich prinzipiell übereinstimmende Befunde, wie aus der Abbildung 2 zu ersehen ist.

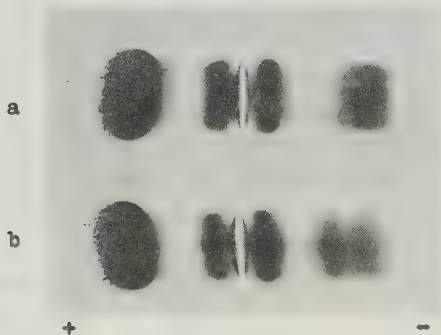


Abb. 2. Agargelelektrophorese eines menschlichen Serums
a) ohne und
b) mit Diphthin.

Vergleichende Immunoelektrophoreseversuche zeigten nun, daß die beiden diphthinbedingten Subfraktionen der γ -Globuline mit einem präzipitierendem Anti-Humanserum vom Kaninchen¹⁾ zwei separate, sich überschneidende Präzipitationslinien bilden (Abb. 3a). Hingegen konnten wir mittels Anti- γ A-Globulin^{2,3)} und Anti- γ M-Globulin²⁾ nie eine Veränderung dieser beiden weiteren Immunglobuline immunoelektrophoretisch feststellen. (Abb. 3b bzw. 3c).

1) Firma Behringwerke, Marburg/L.

2) Centr. Lab. Bloedtr. Dienst, Ned. Roode Kruis, Amsterdam.

3) Nomenklatur der Immunglobuline nach den von der WHO (1964) empfohlenen einheitlichen Bezeichnungen: γ G für γ_2 bzw. 7S- γ , γ A für γ_1 A bzw. β_2 A und γ M für γ_1 M bzw. β_2 M.

Das gleiche war der Fall bei zahlreichen weiteren von uns untersuchten Serumproteinen. (Hierzu sei allerdings bemerkt, daß nicht erhitztes Diphthin infolge seines Gehaltes an Neuraminidase die Wanderungsgeschwindigkeit einer Reihe von Serumfraktionen beeinflußt (SCHIFF 1966, in Vorb.).

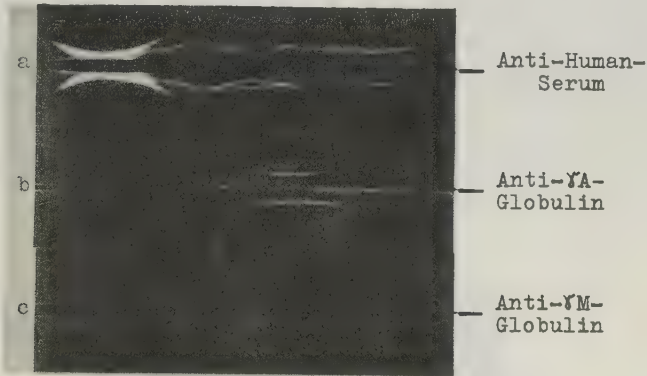


Abb. 3. Immunelektrophorese von diphthinbehandeltem Menschen Serum mit
a) Anti-Humanserum,
b) Anti-γA-Globulin und
c) Anti-γM-Globulin.

Dieselben Befunde ergaben sich mit einem Anti-Rhesusaffenserum (Kaninchen)¹⁾. Mit Anti-Humanserum vom Pferd²⁾ erhielten wir bei unbehandeltem Serum zwei (eine Erfahrung, die auch von anderen Autoren gemacht wurde), bei diphthinbehandeltem Serum drei Präzipitationslinien der γG-Globuline.

1) Firma Behringwerke, Marburg/L.

2) Institut Pasteur, Paris.

Vorstehende Ergebnisse fanden wir ausnahmslos bei der Untersuchung von 130 Menschenserum aller Blutgruppen (überwiegend Blutspenderseren). Lediglich in etwa 10 % der Fälle war zur Erzielung einer deutlichen Aufspaltung der γ -Globulinfraktion eine Nachinkubation unter nochmaligem Diphthinzusatz erforderlich. Bemerkenswerterweise war mit einem monovalenten Anti- γ -Globulin (Kaninchen) nur anfänglich der gleiche Effekt zu erhalten, während mit späteren Antiserum-Chargen stets nur eine einzige, allerdings schwächer und verändert ausgebildete Linie resultierte (Abb. 4). Eine gültige Erklärung für diese Diskrepanz besitzen wir nicht, doch scheint dieselbe auf einer unterschiedlichen Herstellung der monovalenten Antiseren zu beruhen.

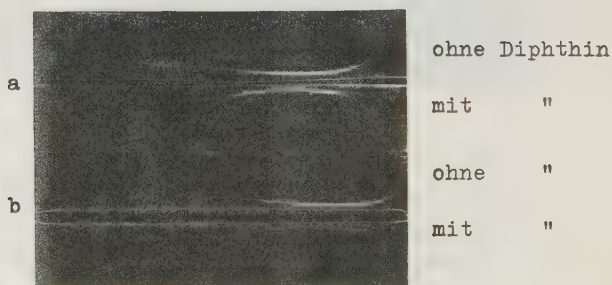


Abb. 4. Immunoelktrophorese des Menschenserums St.
a) mit einem früheren,
b) mit einem Jahr später hergestellten
Anti- γ -Globulin.

Zur Frage, in welchem quantitativem Verhältnis beide diphthinbedingten γ -Globulinquoten zueinander stehen, werteten wir photometrisch die Papier- und Agarelektropherogramme von 10 verschiedenen Menschenserum aus. Hierbei ergab sich ein prozentuales Verhältnis der schnelleren zu langsamer wandernden Quote von 55 : 45 (jeweils $\pm$ 5).

2. Versuche mit tierischen Seren

Wie einleitend erwähnt wurde, beschränkt sich der Diphthineffekt offenbar auf die Hämagglutinine (Hämolysine) von Kaninchen- und Menschenserem und tritt z.B. nicht auf bei entsprechenden Antikörpern von Pferde-, Rinder- und Schafseren. Um zu prüfen, inwieweit sich solche serologischen Unterschiede mit agar- und immunoelktrophoretischen Methoden erfassen lassen, untersuchten wir Seren von insgesamt 11 verschiedenen Tierarten, und zwar jeweils mindestens 10 Seren von Affen (10 von *Cercopithecus aethiops* und 2 von *Macacus cynomolgus*), Kaninchen, Pferden, Rindern, Schweinen, Schafen, Hunden, Ratten (darunter auch solche mit Yoshida- und DS-Tumoren), Meerschweinchen, Mäusen und Hühnern.

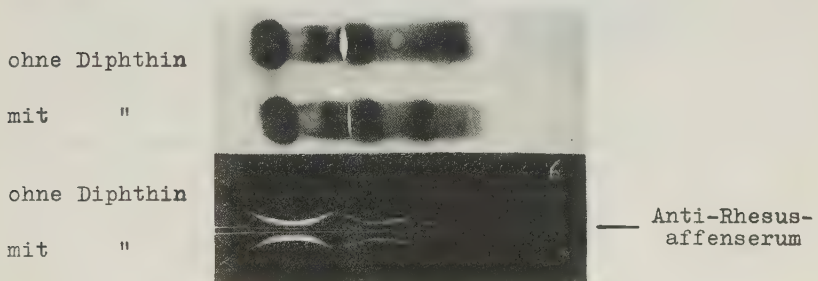


Abb. 5. Agar- und Immunoelktrophorese eines Affenserums (*Cercopithecus aethiops*) ohne und mit Diphthinbehandlung.

Wie aus dem Versuchsbeispiel der Abbildung 5 zu ersehen ist, trat bei den Affenserem die gleiche diphthinbedingte Beeinflussung der γ -Globuline auf wie bei Menschenserem.

Da SCHIFF (1964b) bei seinen serologischen Tierversuchen den Diphthineffekt an Kaninchen-Hämagglutininen nachgewiesen hatte, war zu vermuten, daß die Serum- γ -Globuline dieser Tiere nach Diphthinbehandlung ebenfalls elektrophoretisch nachweisbare Veränderungen zeigen würden. Dies bestätigte sich bei entsprechenden Versuchen, wobei vor allem

eine Konzentrierung der kathodennah liegenden γ -Globulinfraktion auffiel (Abb. 6). Bei der Immunelektrophorese bestanden ähnliche Schwierigkeiten wie bei der Untersuchung von Menschenserum (s.S. 8): Während sich bei unseren ersten Versuchen mit einem präzipitierendem Anti-Kaninchen- γ -Globulin¹⁾ vom Schaf zwei sich überschneidende Linien ergaben (Abb. 7), war späterhin mit einem Antiserum gleicher Herkunft wie auch mit einem Anti-Kaninchenserum²⁾ von der Ziege stets nur eine einzige, zudem verkürzte und abgeschwächte Linie darstellbar.



Abb. 6. Agarelektrophorese eines Kaninchenserums ohne und mit Diphthinbehandlung.

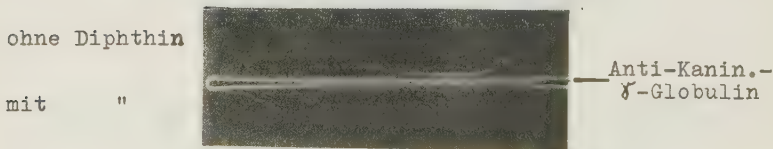


Abb. 7. Immunelektrophorese eines Kaninchenserums mit und ohne Diphthinbehandlung.

1) Firma Hyland, Boston (USA).

2) Firma Behringwerke, Marburg/L.

Insgesamt untersuchten wir über 20 Kaninchenserum, darunter auch einige Immunsere (Anti-Schafblut-, Anti-Meer-schweinchenblut-Serum), die alle letzteres Verhalten zeigten.

Bei allen von uns geprüften Seren der übrigen Tierarten war durch Diphthin (selbst bei Zusatz sehr großer Mengen und mehrtägige Inkubierung) keine agar- und immu-noelektrophoretischen Veränderungen der γ -Globuline fest-zustellen. In der Abbildung 8 ist jeweils ein Versuchs-beispiel wiedergegeben.

3. Versuche mit pathologischen Menschenserum

Von Patientenserum mit unspezifisch erhöhtem γ -Globu-lingehalt (zwischen 25 und 40 rel.%) untersuchten wir ins-gesamt 27 Fälle, und zwar Leberzirrhose (8 Fälle), Hepa-titis (3), Herzinfarkt (2), Emphysebronchitis (2), Infek-tiöse Mononucleose, Arteriitis temporalis, Bronchialkar-zinom, akuter Leukose (jeweils 1 Fall), sowie einige Fälle ohne gesicherte Diagnose. Im allgemeinen verhielten sich solche pathologischen Seren gegenüber Diphthin wie Normal-seren. Eine gewisse Ausnahme bildeten Leberzirrhoseseren, da von 8 Fällen nur 3 das gewohnte Bild einer Aufspaltung der γ -Globuline in zwei Fraktionen zeigten, 4 Fälle erst nach nochmaliger Inkubierung mit einer zusätzlichen gleich großen Diphthinmenge reagierten, während in 1 Fall die γ -Globuline trotz sehr hoher Diphthinkonzentrationen unbe-einflusst blieben.

Da das Diphthin offensichtlich eine nur auf die γ G-Globuline begrenzte Wirkung besitzt, war es von besonderem Interesse, seine Reaktionsfähigkeit gegenüber abartigen γ -Globulinen, wie sie die Paraproteine darstellen, zu stu-dieren. Wir untersuchten daher 22 derartige Seren¹⁾, und zwar von Patienten mit γ G-Plasmozytom (17), γ A-Plasmozytom (2) und Makroglobulinämie Waldenström (3).

¹⁾ Ein großer Teil dieser Seren wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H. Martin, II. Med. Univ.-Klinik, Frankfurt/M., zur Verfügung gestellt.

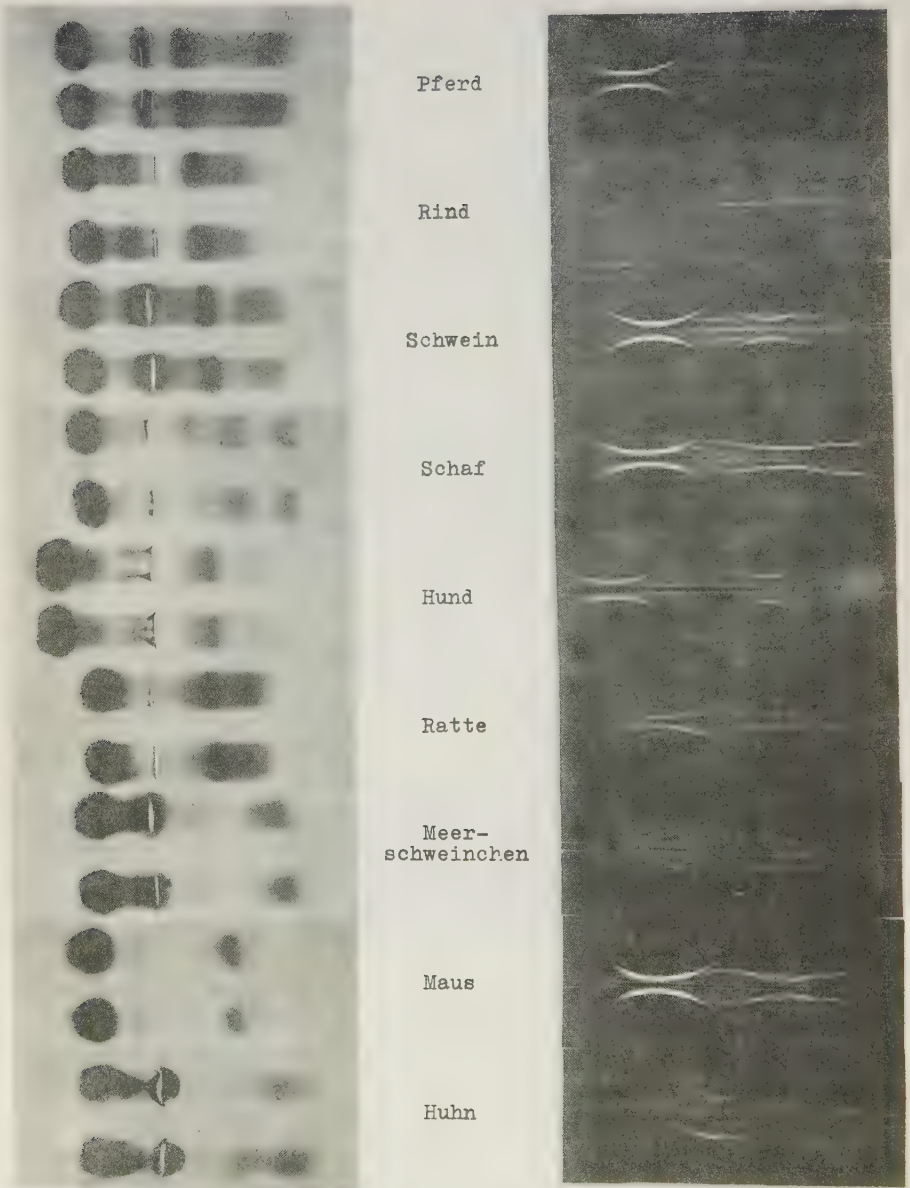
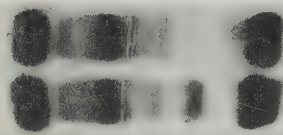


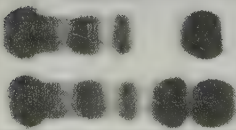
Abb. 8. Agar- und Immunelectrophorese verschiedener Tierseren ohne und mit Diphthhinbehandlung (jeweils obere bzw. untere Hälfte der Präparate).

Die 17 γ G-Plasmozytome hatten ausnahmslos einen stark erhöhten Gehalt an γ -Globulin (teilweise bis über 50 rel.%) und ihr Paraprotein variierte in seiner elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit von der β - bis zur langsamen δ -Mobilität. Bei 13 Seren trat nach Diphthinzusatz eine agar-elektrophoretisch nachweisbare Auftrennung in zwei und bei 2 Seren sogar in drei Subfraktionen auf, und zwar in einer bei normalem γ -Globulin nie beobachteten Deutlichkeit. Bei den 2 übrigen Seren war keine Aufspaltung des Paraproteins zu erkennen.

Wenn auch die diphthinbedingte Aufspaltung hinsichtlich des Abstands der beiden Paraproteinquoten graduell unterschiedlich war, so schien doch eine gewisse Gesetzmäßigkeit zu bestehen: Während nämlich die eine Paraproteinsubfraktion die Wanderungsgeschwindigkeit des unbehandelten Globulins weitgehend beibehielt (sich gelegentlich auch geringfügig verlangsamte), besaß die andere Quote eine veränderte, in allen Fällen aber eine etwa gleichgroße Mobilität. Je nach der ursprünglichen Wanderungsgeschwindigkeit resultierte somit ein unterschiedlicher Abstand zwischen den beiden Fraktionsquoten. Er ist am größten bei langsam wanderndem Paraprotein und verringert sich zunehmend bei schneller wandernden (insgesamt 12 Fälle). Bei einer bestimmten Mobilität können sich beide Anteile offensichtlich überdecken (1 Fall, s. später) und bei noch größerer Beweglichkeit äußerte sich die Abspaltung einer kathodenwärts auftretenden Bande (3 Fälle). Was die in 3 Fällen beobachtete dritte Subfraktion betrifft, so fanden wir sie nur bei sehr langsamem Paraprotein, und zwar ebenfalls kathodenwärts. In Abbildung 9 sind 5 typische Beispiele dieser verschiedenen Verhaltensweisen wiedergegeben. Die jeweils gleichzeitig mittels Anti-Humanserum (vom Kaninchen) durchgeführten Immunoelktrophoresen ergaben bei den Plasmozytomseren, die agarelektrophoretisch einen Diphthineffekt zeigten, zusätzliche Präzipitationslinien im γ -Globulinbereich. Allerdings waren diese nicht allzu deutlich abgrenzbar, um eine sichere Beurteilung zu gestatten. Genaue Aussagen werden sich hier erst durch Untersuchungen mit



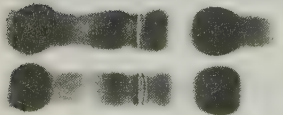
Fall Ha.



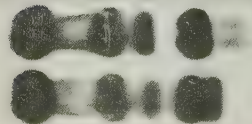
Fall Pl.



Fall Sa.



Fall Sch.



Fall M6.



Abb. 9. Agar- und Immunoelktrophorese verschiedener γ G-Plasmozytomseren ohne und mit Diphthhinbehandlung (jeweils obere bzw. untere Hälfte der Präparate).

fraktionsspezifischen Immunseren machen lassen. Bemerkenswerterweise reagierte ein schnelles γ G-Paraprotein, das nach Diphthineinwirkung agarelektrophoretisch unverändert blieb, immunoelktrophoretisch mit einer Aufspaltung der entsprechenden Präzipitationslinie. Vermutlich überdeckten sich in

diesem Falle die beiden Paraproteinquoten aufgrund gleicher Wanderungsgeschwindigkeiten. Der zweite Fall zeigte auch immunoelektrophoretisch keinen Diphthineffekt.

Bei den untersuchten γ A-Plasmozytom- und Makroglobulinämieseren war weder agar- noch immunoelektrophoretisch eine Beeinflussung der jeweiligen pathologischen Immunoglobuline durch Diphthin festzustellen, was mit den beiden Beispielen der Abbildung 10 belegt sei. Dieser Befund deckt sich mit unseren bei den entsprechenden Globulinen von Normalseren gemachten Erfahrungen.

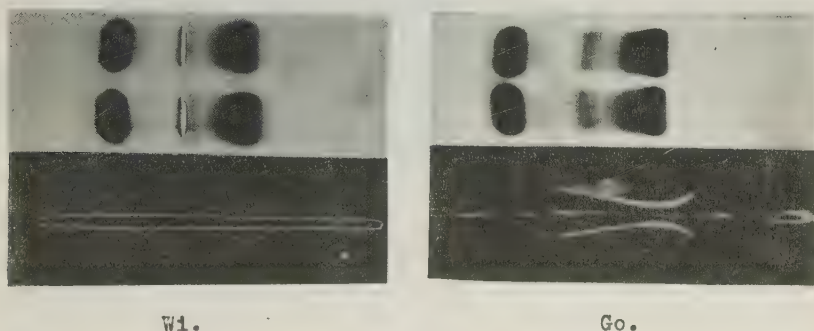


Abb. 10. Agar- und Immunoelektrophorese eines mit γ A-Plasmozytom (W1.) und Makroglobulinämie Waldenström (Go.) ohne und mit Diphthinbehandlung.

4. Weitere Untersuchungen

Der Hämagglutininhemmungsmechanismus von Diphthin ist von SCHIFF als ein selektives Adsorptionsgeschehen gedeutet worden (s.S. 2). Vorstehenden Untersuchungen zufolge erstreckt sich der Effekt des Diphthins aber offensichtlich über die Hämagglutinine bzw. Hämolysine hinaus auf die gesamte Fraktion der γ G-Globuline von Mensch (bzw. Affe) und Kaninchen. Die hierbei beobachtete Aufspaltung dieser Serumglobuline in zwei Subfraktionen ließen daran denken, daß es

sich bei der Diphthinwirkung um einen fermentativen Prozeß handeln könnte. Diese Vermutung lag umso näher, als von anderen Autoren über ähnliche immunoelektrophoretische Befunde nach Aufspaltung von γ G-Globulin mit Proteinasen wie Papain (EDELMAN, HEREMANS, HEREMANS und KUNKEL, 1960; FRANKLIN, 1960) und Trypsin (SCHULTZE und SCHWICK, 1957; BURTIN, 1962) berichtet worden war. Wir versuchten daher durch einige weitere Experimente nähere Anhaltspunkte für eine mögliche Fermentnatur des Diphthins zu gewinnen.

Bei agar- und immunoelektrophoretischen Versuchen verglichen wir zunächst die Wirkung von Diphthin mit der von Papain auf menschliches γ G-Globulin.

Die Papainverdauung von Serum geschah nach einer von PEETOM (1963) angegebenen Methode: Eine 1,5%ige Lösung von gereinigtem Papain (60.000 E/g, Firma Merck, Darmstadt) in Phosphatpuffer (pH 7,0) wurde mit Serum im Verhältnis 1:1 gemischt und 18 Std. bei 37 °C inkubiert. Die Diphthinbehandlung erfolgte in gleicher Weise unter Verwendung einer 0,1%igen Diphthinlösung.

Bei diesen Vergleichsuntersuchungen zeigte sich übereinstimmend, daß Papain menschliches γ G-Globulin ebenfalls in zwei Fraktionen aufzutrennen vermag, wobei bei der Agarelektrophorese die beiden Anteile allerdings weiter auseinander liegen als nach Diphthinbehandlung. Bei der Immunelektrophorese zeigten die beiden sich überschneidenden Präzipitationslinien ein entsprechendes Verhalten. In der Abbildung 11 ist ein entsprechendes Versuchsbeispiel wiedergegeben. Ergänzend sei hierzu bemerkt, daß bei Verwendung eines Anti- γ G-Globulins (anstelle eines Anti-Human-Serums) auch die beiden Papainquoten nur mit einer einzigen Präzipitationslinie reagierten.

Im Hinblick auf diesen ähnlichen Effekt auf die γ G-Globuline tauchte die Frage auf, ob das Papain ebenfalls eine intravitale hämagglutininhemmende Wirkung besitzt. Im serologischen Maustest verglichen wir daher beide Substanzen miteinander.

Es wurden hierzu jeweils 0,2 ml eines auf 1/2 verdünnten Anti-Meerschweinchenblut-Immunserums vom Kaninchen mit 0,2 ml fallender Verdünnungen einer 0,02%igen Diphthin- bzw. 1%igen Papainlösung (60.000 E/g) und 0,4 ml physiologischer NaCl-Lösung 6 Stdn. bei 22°C inkubiert und 0,4 ml der einzelnen Mischungen je einer Maus (25 g) intravenös appliziert. 20 Stdn. post inj. wurden die Tiere entblutet und die einzelnen Seren auf ihren Gehalt an Anti-Meerschweinchen-Hämagglutinin geprüft.

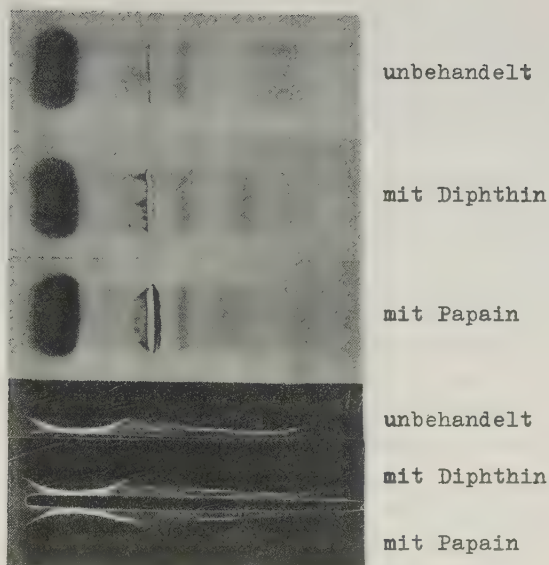


Abb. 11. Agar- und Immunelectrophorese eines menschlichen Normalserums ohne und mit Diphthin- oder Papainbehandlung.

Parallel hierzu wurden die 6 Stdn. inkubierten Gemische auf 1 : 20 in NaCl-Lösung verdünnt (entsprechend dem ungefähren intravitalen Verdünnungsgrad) und ihr Hämagglutinititer gegen Meerschweinchen-Blutkörperchen bestimmt.

Wie aus der Abbildung 12 ersichtlich ist, bewirkte das Diphthin in vitro trotz 6-std. Inkubierung mit dem Anti-Meerschweinchen-Hämagglutinin keine Titerverminderung; eine solche trat erst im tierischen Organismus auf, und zwar betrug die minimale Hemmdosis des Diphthins (0,02%ig) $\frac{0,01}{16}$ ml für 0,05 ml Hämagglutinin. Demgegenüber erfolgte durch eine 6-std. Inkubierung mit Papain bereits in vitro eine starke Titerreduktion¹⁾, deren

¹⁾ Auf die Möglichkeit einer Mitreaktion von inkompletten Antikörpern infolge einer "Papainisierung" der Erythrozyten sei hierbei hingewiesen.

Hämagglu-
tinin-
Titer

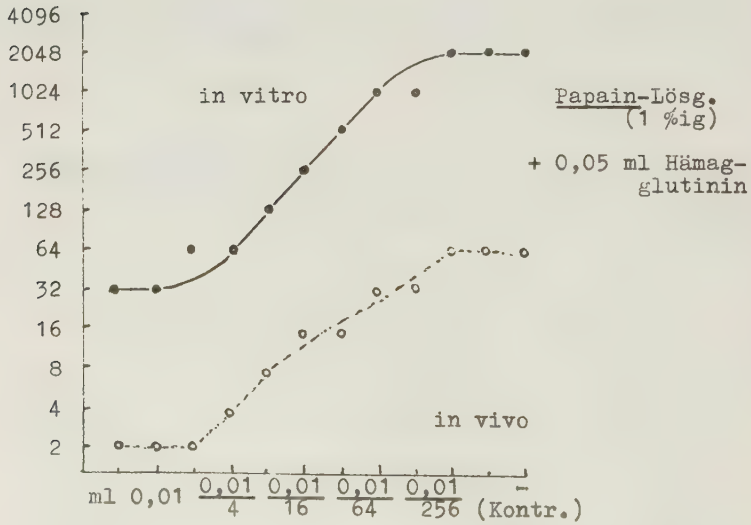
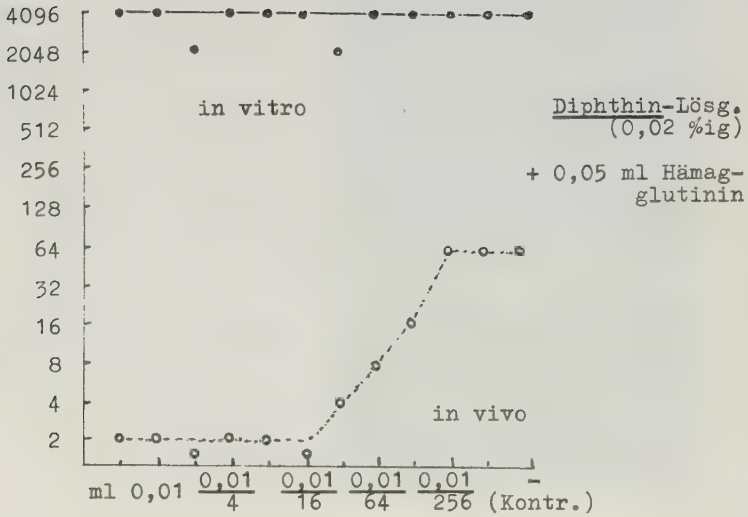


Abb. 12. In-vivo- und in-vitro-Effekt von Diphthin und Papain auf Anti-Meerschweinchen-Hämagglutinin nach 6-std. Inkubierung bei 37°C.

Maximalwert durch etwa 0,01 ml Papain (1%ig) erreicht wurde, weitgehend parallel hierzu bewegte sich die im serologischen Maustest erhaltene Dosis-Wirkungs-Kurve. Diese differenten Befunde weisen auf wesentliche Unterschiede in der Wirkungsweise von Diphthin und Papain hin.

Aus der angegebenen minimalen Hemmkonzentration kann das ungefähre Molverhältnis zwischen Diphthin (Mol.-Gew. ca. 15.000) und Hämagglutinin vom Kaninchen (Mol.-Gew. 145.000) errechnet werden. Bei einem angenommenen Gehalt des betreffenden Serums an 0,2 % Hämagglutinin bzw. Hämolyisin ergibt sich ein Gewichtsverhältnis von ca. 800 : 1, was einem Molverhältnis von etwa 80 : 1 entspricht. Dieser Befund deutet auf einen enzymatischen Vorgang hin.

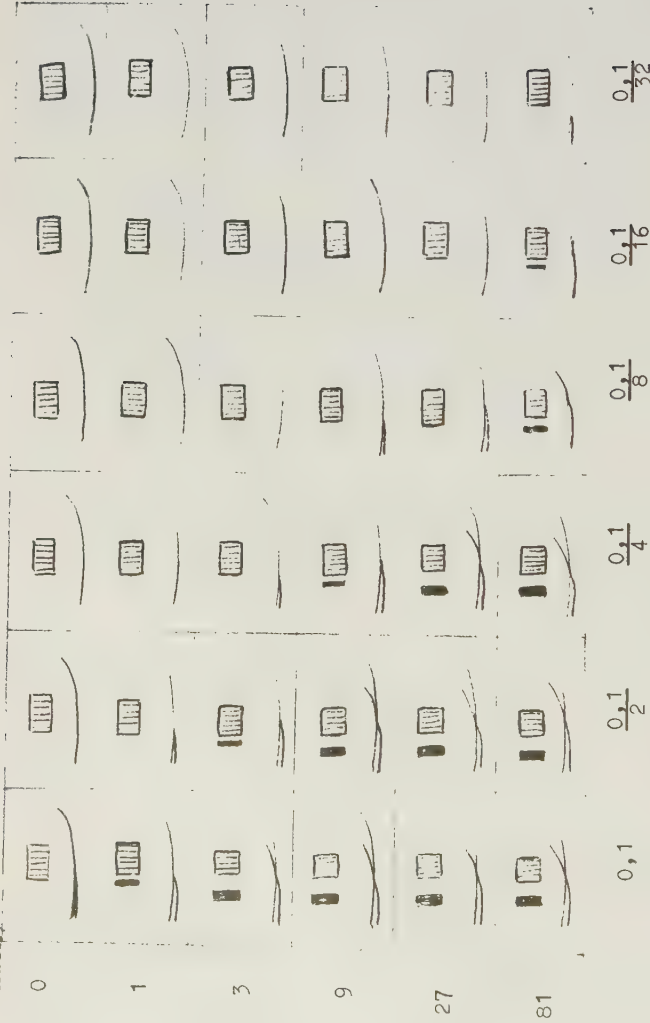
Bei der von uns agar- und immunoelektrophoretisch festgestellten γ G-Globulinaufspaltung durch Diphthin liegen offenbar ähnliche quantitative Verhältnisse vor. Dies geht aus Untersuchungen hervor, bei denen die Abhängigkeit des Diphthineffekts auf die γ G-Globuline von Diphthinmenge und Inkubationsdauer geprüft wurde.

Bei diesem Versuch mischten wir menschliches Normalserum im Verhältnis 5 : 1 mit Diphthinlösungen, deren Diphthingehalt um den Verdünnungsfaktor 2 von 0,2 bis 0,0031 % variierte. Die einzelnen Gemische wurden sodann gegen ein Anti-Humanserum (vom Kaninchen) untersucht, und zwar sofort nach Mischung sowie nach 1, 3, 9, 27 und 81-std. Inkubierung bei 5°C.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in der Abbildung 13 aufgezeigt. Es wird hieraus eine direkte Abhängigkeit der γ G-Globulinaufspaltung von Diphthinmenge und Inkubationsdauer deutlich, was bereits SCHIFF (1964a) bei seinen serologischen Versuchen mit Hämagglutininen beobachtet hatte.

Schließlich wiesen wir immunoelektrophoretisch nach (s. Abbildung 14), daß bei einer Inkubationstemperatur von 37°C der γ G-Globulin/Diphthineffekt stärker als bei 22°C oder gar 5°C ist. Kein sicherer Effekt war hingegen bei 56°C nachweisbar, auch nicht nach anschließender Inkubierung bei Zimmertemperatur. Letztere Beobachtung stimmt mit der Erfahrung von SCHIFF überein, wonach eine Inkubierung bei 56°C keine intravitale Hämagglutininhemmung zur Folge hat.

Inkuba-
tionszeit
(Stunden)



ml Diphthinelösg. (0,2%ig)

Abb. 13. Diphthineffekt bei menschlichem γ G-Globulin in Abhängigkeit von Inkubationszeit und Diphthinkonzentration bei + 5°C (Agar- und Immuoelektrophorese, schematisch).

Inkubations-
temperatur

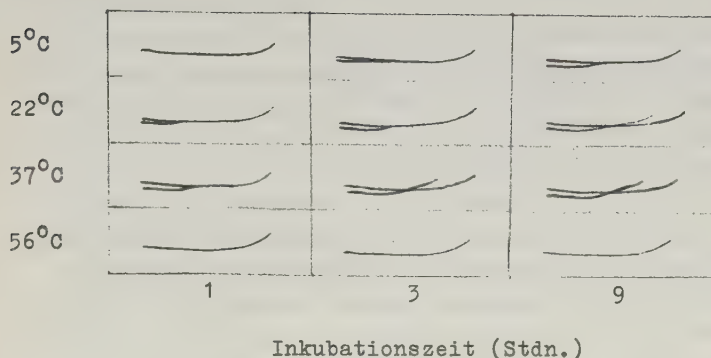


Abb. 14. Diphthineffekt bei menschlichem XG-Globulin in Abhängigkeit von Inkubationszeit und -temperatur. Diphthinlösung 0,1%ig. (Immunoelektrophorese, schematisch).

Somit erscheint es möglich, daß die hämagglutinin-hemmende und XG-Globulin spaltende Wirkung des Diphthins ein und denselben Vorgang darstellt. Um dies definitiv entscheiden zu können, wären entsprechende Vergleichsuntersuchungen, z.B. mit einem Anti-Schaf-Hämagglutinin vom Kaninchen, angezeigt. Mangels geeigneter präzipitierender Anti-Kaninchenserum (s.S.10) mußten diese Versuche jedoch unterbleiben. Bei unseren Versuchen, hierfür menschliches Immunhämagglutinin (Anti-A oder Anti-B, jeweils frei von Anti-Maus-Hämagglutininen) zu verwenden, machten wir andererseits die Erfahrung, daß nach Injektion diese Antikörper (ohne Diphthinzusatz) im Serum der Mäuse nicht mehr nachweisbar waren.

D. B e s p r e c h u n g .

Im Rahmen seiner Untersuchungen zur Aufklärung des sogenannten Seemüller-Phänomens (Literaturübersicht s. bei SCHIFF 1964a) gelangte SCHIFF zur Auffindung des Polypeptids Diphthin. Die bei seinen tierexperimentellen Untersuchungen aufgetretene intravitale Antikörperhemmung ist von ihm als ein selektiver Adsorptionsvorgang zwischen Hämagglutininen (Hämolysinen) und Diphthin gedeutet worden. Dieses serologische Geschehen ist nur im Hämolyseschutzversuch oder im serologischen Tiertest nachweisbar. Mit vorstehenden agar- und immunoelektrophoretischen Untersuchungen wurde ein allgemeiner Diphthineffekt auf die γ G-Globuline von Mensch und Kaninchen festgestellt, wobei diese Serumeiweißfraktion in zwei Quoten aufgespalten wird. Inwieweit beide Diphthinwirkungen tatsächlich identisch sind, ist noch nicht endgültig geklärt.

Was speziell den γ G-Globulineffekt betrifft, so hatte bereits POULIK (1956, 1959) bei seinen Studien über das Diphtherietoxin mittels Stärkegel- und Papierelektrophorese nachgewiesen, daß mit einigen Toxinpräparaten die Wanderungsgeschwindigkeit etlicher menschlicher Serumproteinfraktionen, darunter auch der γ -Globuline, beeinflußt wird. Durch SEEMÜLLERS Arbeiten angeregt, untersuchte er diesen Effekt näher. Hierbei beobachtete er nach Inkubierung von Menschenseren mit gereinigten Diphtherietoxinen (v.a. mit weniger reinen Präparaten) eine elektrophoretische Verlangsamung des Transferrins, Haptoglobins und Coeruloplasmins, sowie eine Aufspaltung der γ -Paraproteinfraktion einiger Plasmozytomseren (POULIK, 1961); dies führte er auf die Wirksamkeit einer im Diphtherietoxin enthaltenen Neuraminidase zurück. Ein Gehalt des Diphtherietoxins an diesem Enzym ist von HEIDE und HAUPT (1962) wie auch von WARREN und SPEARING (1963) chemisch nachgewiesen worden, wobei erstere Autoren mit Diphtherie-Rohtoxin und mit der aus Kulturfiltraten von *V. cholerae* gewonnenen Neuraminidase RDE (receptor destroying enzyme) identische Serumproteinverschiebungen erzielten. Zwar wurde von SCHIFF (1966, in Vorb.) auch im gereinigten Diphthin eine Neuraminidase-

aktivität festgestellt, doch ist diese nicht für dessen Antikörperhemmvermögen verantwortlich: Denn durch Erhitzen des hitzestabilen Diphthins wird nur seine Neuraminidase-wirkung aufgehoben, während seine Fähigkeit zur Antikörperhemmung bzw. sein Effekt auf die γ G-Globuline erhalten bleibt. Zudem lassen sich mit RDE weder eine Veränderung der γ G-Globuline noch eine Hämagglutininhemmung im serologischen Maustest nachweisen. Da die von POULIK berichtete Aufspaltung der γ G-Paraproteine offenbar unseren mit Diphthin gewonnenen Befunden entspricht, ist andererseits anzunehmen, daß einige seiner gereinigten Toxinpräparate außer Neuraminidase auch Diphthin enthielten. Diese Annahme steht in Einklang mit SCHIFFs Vermutung (1964d), daß auch das von SEEMÜLLER (1954) für seine Hämolyseschutzversuche verwendete hochgereinigte Diphtherietoxin von POPE mit einem Gehalt an Diphthin belastet war.

Wie mit unseren Versuchen gezeigt werden konnte, besteht einige Ähnlichkeit zwischen der Wirkung des eigentlichen Diphthins und der von Proteinasen, insbesondere von Papain. Für einen wahrscheinlichen Fermentcharakter des Diphthins sprechen zudem folgende Erfahrungen:

Die Diphthinwirkung ist von Inkubationsdauer und -temperatur abhängig. Es besteht ein für Fermente adäquates Molverhältnis (bei 22°C) zwischen γ G-Globulin und Diphthin von etwa 80 : 1 (In diesem Zusammenhang sei bemerkt, daß zur Spaltung des γ G-Globulins durch reduzierende Substanzen wie Mercaptoäthanol letztere in erheblichem Überschuß zugegeben werden müssen. FLEISCHMAN, PAIN und PORTER (1962) beachteten hierbei ein Mischungs-Molverhältnis von γ G-Globulin und Mercaptoäthanol von etwa 1 : 6.000 - allerdings bei 0°C.).

Wenn auch Angriffspunkt und Wirkungsweise des Diphthins noch ungeklärt sind, so bestehen doch wesentliche Unterschiede gegenüber Papain und sonstigen Proteinasen: Soweit bis jetzt nachgewiesen, bewirkt das Diphthin nur eine selektive Spaltung der γ G-Globuline von Menschen-, Affen- und Kaninchenserum bzw. von menschlichen γ G-Paraproteinen, wobei auch nach sehr langer Inkubationszeit ein bestimmter Abbaugrad nicht überschritten wird. Dies

besagt, daß nicht nur zwischen den γ G-Globulinen der genannten Seren und deren sonstigen Immunoglobulinen, sondern auch zwischen den γ G-Globulinen verschiedener Tierarten ganz bestimmte strukturelle Unterschiede bestehen müssen. Andererseits bedeutet dies, daß es sich beim Diphthin um eine neu aufgefundene Proteinase von ausgeprägt selektivem Wirkungscharakter handeln dürfte.

Was die diphthinbedingte Aufspaltung der γ G-Paraproteine in zwei Quoten betrifft, so scheint die eine hinsichtlich ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit bzw. elektrischen Ladung bei allen Paraproteinen identisch zu sein, während die zweite Quote, die stets etwa die ursprüngliche Mobilität beibehält, für die Beweglichkeit des Gesamt-Paraproteins verantwortlich sein könnte. Eine Erklärung für das in 2 Fällen beobachtete Auftreten einer dritten Diphthinfraktion besitzen wir nicht.

Klärung der vorstehenden Beobachtungen und Probleme setzt ein Arbeiten mit gereinigten γ G-Globulinfraktionen und -subfraktionen sowie eingehende chemische und physikalische Untersuchungen voraus. Da es sich beim Diphthin um eine Substanz von ausgeprägt individueller Wirkungsweise handelt, kann erwartet werden, daß durch solche Studien nicht zuletzt weitere Aufschlüsse über Struktur und Funktion der γ G-Globuline erbracht werden können.

E. Zusammenfassung

Es wurde der Effekt des aus Kulturfiltraten von Diphtheriebakterien isolierten Hämolyseschutzstoffes Diphthin auf die γ -Globulinfraktion von menschlichen und tierischen Seren agar- und immunoelektrophoretisch untersucht. Hierbei ergab sich, daß nach Inkubierung mit Diphthin eine Auftrennung der γ G-Globuline von Menschen-, Affen- und Kaninchenserum erfolgt, die mit spezifischen Antiseren zwei sich überschneidende Präzipitationslinien bilden. Eine Beeinflussung anderer Serumproteine, vor allem von γ A- und γ M-Globulinen, konnte nicht nachgewiesen werden. Auch war keine Veränderung des elektrophoretischen Verhaltens der γ -Globuline von 9 weiteren Tierarten (Pferd, Rind, Schwein, Schaf, Hund, Ratte, Meerschweinchen, Maus und Huhn) feststellbar. Diphthinbehandelte γ G-Plasmozytomserum zeigten eine Aufspaltung der Paraproteinfraktion in ebenfalls zwei, in einigen Fällen sogar in drei Quoten, wobei deren elektrophoretischer Abstand offenbar in Beziehung zur Wanderungsgeschwindigkeit des unbehandelten Paraproteins steht.

Eingehendere Untersuchungen ergaben, daß diese Aufspaltung der γ G-Globuline von der Diphthinmenge, Inkubationsdauer und -temperatur abhängt. So war z.B. ein maximaler Trenneffekt durch eine 3 bzw. 27-std. Inkubierung bei 5°C eines Menschenserums mit Diphthin bei einem Molverhältnis von γ G-Globulin : Diphthin von etwa 2,5 : 1 bzw. 10 : 1 zu erzielen. Bei 22°C bzw. 37°C verändert sich dieses Verhältnis auf etwa 10 bzw. 40 : 1. Diese Befunde sprechen dafür, daß es sich beim Diphthin um ein eiweißspaltendes Ferment handeln dürfte, zumal sich ähnliche agar- und immunoelektrophoretische Ergebnisse auch mittels Papain oder Trypsin erzielen lassen.

Zum Unterschied zu anderen Proteinasen beeinträchtigt das hitzestabile und atoxische Diphthin nicht die Aktivität von hämagglutinierenden Antikörpern und reagiert offenbar nur mit den γ G-Globulinen von wenigen Tierespezies.

F. L i t e r a t u r

- BURTIN, P.: Etudes immunologiques sur la structure antigenique des γ -globulines humaines. In: Protides of the Biological Fluids. Elsevier, Amsterdam, 1962, S. 284.
- EDELMAN, G.M., HEREMANS, J.F., HEREMANS, M.Th. und KUNKEL, H.G.: Immunological Studies of Human γ -Globulin. J. Exp. Med. 112, 203 (1960).
- FLEISCHMAN, J.B., PAIN, R.H. und PORTER, R.R.: Reduction of γ -Globulins. Arch. Biochem. Biophys. Suppl. I, 174 (1962).
- FRANKLIN, E.C.: 7S- γ -Globulin. J. Clin. Invest. 39, 1933 (1960).
- HEIDE, K. und HAUPT, H.: Über die Neuraminidase aus Diphtherietoxin. Naturwiss. 49, 15 (1962).
- PORTER, R.R.: The Hydrolysis of Rabbit γ -Globulin and Antibodies with Crystalline Papain. Biochem. J. 73, 119 (1959).
- POULIK, M.D.: Test of Purity of Diphtheria Toxins by Elektrophoresis in Starch Gel. Nature 177, 982 (1956).
- POULIK, M.D.: Starch Gel Immunoelktrophoresis. J. Immunol. 82, 502 (1959).
- POULIK, M.D.: Interaction of Transferrin, Haptoglobin and other Serum Proteins with Neuraminidase of Diphtheria Toxin. Clin. Chim. Acta 6, 493 (1961).
- PEETOM, F.: The Agar Precipitation Technique and its Application as a Diagnostic and Analytical Method. Stenvert Kroese N.V., Leiden, 1963.
- SCHIFF, W.: Untersuchungen zum Seemüller-Phänomen. III. Mitt.: Der serologische Nachweis der intravitalen Bindung von Hämagglutininen und Hämolysinen durch Diphtherie-Toxin. Z. Immunforschg. 122, 95 (1961).
- SCHIFF, W.: Über den Hämagglutininbindungsmechanismus des Hämolyseschutzstoffes Diphthin. Z. Immunforschg. 127, 266 (1964a).

- SCHIFF, W.: Über den intravitalen Hämagglutininhemmungs-Mechanismus von Diphthin.
Z. Immunforschg. 127, 296 (1964b).
- SCHIFF, W.: Zur Frage der Bindung zwischen Diphthin und Diphtherie-Antitoxin ("Antidiphthin").
Z. Immunforschg. 127, 400 (1964c).
- SCHIFF, W.: Physikalisch-chemische und immunologische Eigenschaften von gereinigtem Diphthin.
Z. Immunforschg. 127, 479 (1964d).
- SCHIFF, W. und HEIDE, H.: In Vorb. (1966).
- SCHULTZE, H.E. und SCHWICK, G.: Immunochemischer Nachweis von Proteinveränderungen unter Berücksichtigung fermentativer Einwirkungen auf Glyco- und Lipoproteine. Immunelektrophoretische Studien.
Behringwerke-Mitt. 33, 11 (1957).
- SEEMÜLLER, H.: Über die Bindung von Hämagglutinin und Diphtherie-Toxin.
Z. Immunforschg. 111, 485 (1954).
- WARREN, L. und SPEARING, W.C.: Sialidase (Neuraminidase) of *Coryneb. diphtheriae*.
J. Bacteriol. 86, 950 (1963).
- World Health Organization: Nomenclature for Human Immunoglobulins.
Bull. Wld. Hlth. Org. 30, 477 (1964).

Herrn Prof. Dr. med. R. SIEGERT bin ich für die mir in seinem Institut zur Verfügung gestellte Arbeitsmöglichkeit zu großem Dank verpflichtet.

Ganz besonders danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. W. SCHIFF für die Überlassung des Themas und seine ständige Hilfsbereitschaft bei der Abfassung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 28. 9. 1939 wurde ich, Karl Fritz S t o c k a m p, als Sohn des Dr. Ing. Karl Stockamp und der Ärztin Ilse Stockamp, geb. Henrich, in Gießen/Lahn geboren. Meine Schulzeit in Wetzlar/Lahn bestand aus 4 Volksschuljahren und 9 Jahren an dem dortigen Real-Gymnasium, dessen Reifezeugnis ich am 27. 2. 1959 erhielt. Mein Medizinstudium begann ich in Marburg. Vom 5. bis 7. Semester studierte ich nacheinander in Mainz, Freiburg und Genf. Im 8. Semester kehrte ich nach Marburg zurück und legte hier das Medizinische Staatsexamen am 25. 2. 1965 ab. Zur Zeit bin ich als Medizinalassistent im 2. Jahr am Stadtkrankenhaus Wetzlar tätig.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten

- in Marburg: Beckmann, Berendes, Braun-Falco, Bücher, Dimroth, Gedigk, Hamm, Hartmann, Hensel, Heuser, Hornung, Huber, Jacob, Keßler, Linneweh, Lübbers, Mahr, Neubauer, Niessing, Overbeck, Petry, Schleyer, Schmid, Schölmerich, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Straub, Walcher, Würterle.
- in Mainz: Bäßler, Dabelow, Ehrenbrandt, Lang, Schriever, Siebert.
- in Freiburg: Bätzner, Büchner, Haas, Heilmeyer, Hoffmann, Kern, Schubothe.
- in Genf: Bickel, Duchosal, Frommel, Martin, Regamey, Rudler, Rutishauser, Sarasin, Walthard, de Watteville.

